

jc997 U.S. PTO  
09/988863



PATENT APPLICATION  
Mo6761  
LeA 35,018

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

APPLICATION OF )  
RUTH MEISSNER ET AL )  
SERIAL NUMBER: TO BE ASSIGNED )  
FILED: HEREWITH )  
TITLE: PLANT PHOSPHOMEVALONATE )  
KINASES )

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 USC 119**

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicants hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, 119, as stated on their previously submitted Declaration and Power of Attorney document. Applicants further submit the enclosed certified copies of German application 100 57 755.5, claiming foreign priority on the above-identified U.S. application.

Respectfully submitted,

By

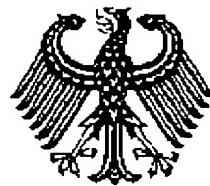
A handwritten signature of "Raymond J. Harmuth" is written over a horizontal line.

Raymond J. Harmuth  
Attorney for Applicants  
Reg. No. 33,896

Bayer Corporation  
100 Bayer Road  
Pittsburgh, Pennsylvania 15205-9741  
(412) 777-8366  
FACSIMILE PHONE NUMBER:  
(412) 777-8363

/jme/RJH0019

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



jc997 U.S. PTO  
09/988863



11/21/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 57 755.5

**Anmeldetag:** 22. November 2000

**Anmelder/Inhaber:** Bayer AG, Leverkusen/DE

**Bezeichnung:** Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen

**IPC:** C 12 N, C 07 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. September 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Ebert

**Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen**

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen kodieren, die davon die kodierten Polypeptide sowie deren Verwendung als Targets für Herbizide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

Unerwünschtes Pflanzenwachstum kann durch die Verwendung von Herbiziden verhindert werden. Die Ansprüche an Herbizide sind dabei hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Kosten und Umweltverträglichkeit stetig angestiegen. Es existiert deshalb ein Bedarf an neuen Substanzen, die zu leistungsfähigen neuen Herbiziden entwickelt werden können. Im Allgemeinen ist es üblich, in Gewächshaus tests nach solchen neuen Leitstrukturen zu suchen. Solche Tests sind jedoch arbeitsintensiv und teuer. Die Anzahl der Substanzen, die im Gewächshaus getestet werden können, ist entsprechend begrenzt.

Vorteilhafte Angriffspunkte für Herbizide werden in essentiellen Biosynthesewegen gesucht. So führt die Biosynthese von Isoprenoiden in Pflanzen u.a. zur Synthese von Carotinoiden sowie der Seitenketten des Plastochinons und des Chlorophylls. Diese Produkte sind für das photosynthetische Wachstum von Pflanzen unerlässlich. Die Inhibition eines Schrittes in diesem Biosyntheseweg führt zur Beendigung des Wachstums einer Pflanze. Des weiteren werden aus Isoprenoiden Pflanzenhormone wie Gibberelinsäure, Abscisinsäure und Brassinosteroide und Membrankomponenten (Phytosterole) gebildet, die auch für das Wachstums der Pflanze essentiell sind.

Isopentylidiphosphat (IPP) ist der Verzweigungspunkt von dem aus die verschiedensten Isoprenoide gebildet werden. Die Herstellung von IPP ist daher ein kritischer Punkt im Pflanzenstoffwechsel. In Pflanzen wird IPP über zwei verschiedene Stoffwechselwege in verschiedenen Kompartimenten hergestellt. Im

Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Cytosol verläuft die Synthese von IPP über den klassischen Acetat/Mevalonat-Stoffwechselweg, wie er auch im tierischen Organismus abläuft. Dagegen wird in Chloroplasten IPP über den alternativen Glycerinaldehydphosphat/Pyruvat-Stoffwechselweg synthetisiert. Beide Stoffwechselwege sind essentiell, da verschiedene isoprenoide Metaboliten in den verschiedenen Kompartimenten gebildet werden. Außerdem ist noch nicht geklärt inwieweit die beiden Stoffwechselwege autonom sind oder Metabolitenaustausch zwischen den Kompartimenten stattfindet (Heintze et al., 1990, Kleinig, 1989).

- 10 Clomazone ist eine bekannte herbizide Verbindung, die den Gehalt an Carotinoiden und Chlorophyll im Blatt verringert. Es wurde lange Zeit angenommen, dass Clomazone über die Hemmung des Isoprenoid-Stoffwechselwegs wirkt. Norman et al. (1990) hatten gezeigt, dass der Wirkort zwischen Mevalonat und Geranylgeranyl Pyrophosphat liegen müsste. Das würde den Wirkort auf eines der dazwischen liegenden fünf Enzyme, von denen eines die Phophomevalonat Kinase ist, festlegen. Etwas neuere Arbeiten von Weimer et al. (1992) und Rodney Croteau (1992) weisen allerdings darauf hin, dass der Angriffspunkt von Clomazone an einer anderen Stelle zu suchen ist.
- 20 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine cDNA aus *Arabidopsis thaliana* cv. columbia mit Homologie zur Phophomevalonat Kinase, im folgenden mit PMVK abgekürzt, aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (Abb. 1). Dieses Gen konnte in *Arabidopsis thaliana* cv. columbia durch Behandlung mit dem Herbizid Chlorsulfuron (10g/ha) induziert werden.
- 25 Die Homologie zwischen der *Saccharomyces cerevisiae* PMVK (= ERG8) und der aus *A. thaliana* isolierten cDNA beträgt 44% Ähnlichkeit bzw. 35% Identität (siehe Abb. 1). Dies entspricht z.B. der Homologie zwischen der *Saccharomyces cerevisiae* Mevalonat Kinase und der *Arabidopsis thaliana* Mevalonat Kinase mit einer Ähnlichkeit von 45 % und einer Identität von 35 %. Für die Mevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* konnte die Funktion durch Komplementation der

entsprechenden Mutante aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Des weiteren weist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte cDNA eine 69 %ige Identität zu einer partiellen PMVK-Sequenz aus *Pinus radiata* gemäß SEQ ID NO:5 auf, die zur Modifikation von Isoprenoid-Gehalt, Isoprenoid-Zusammensetzung und Isoprenoid-Stoffwechsel von Pflanzen von Interesse ist (WO 00/36 081). Weitere partielle cDNAs aus Pflanzen (*Medicago trunculata*, Accession Number AA660847, siehe SEQ ID NO:3 und *Gossypium hirsutum*, Accession Number AI727861, siehe SEQ ID NO:4) sind als putative PMVKS isoliert worden. In Datenbanken sind aus verschiedenen Sequenzierungsprojekten verschiedene Sequenzen (ESTs und genomische Sequenz) aus *Arabidopsis* spp. zu finden, die der hier isolierten PMVK-Sequenz oder Teilen davon entsprechen, allerdings werden zu diesen Sequenzen oder Sequenzfragmenten keine Angaben zu Funktion oder Bedeutung gemacht.

15 Durch die vorliegende Erfindung wird nun zum ersten Mal die vollständige cDNA Sequenz einer pflanzlichen Phosphomevalonat Kinase zur Verfügung gestellt und deren Verwendung bzw. die Verwendung des davon kodierten Polypeptids zur Identifizierung neuer herbizider Wirkstoffe beschrieben.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb Nukleinsäuren, die für vollständige pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen kodieren, mit Ausnahme der partiellen Nukleinsäuresequenzen aus *Medicago trunculata* gemäß SEQ ID NO:3, *Gossypium hirsutum* gemäß SEQ ID NO:4 und aus *Pinus radiata* gemäß SEQ ID ND:5.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Nukleinsäuren, die für die Phosphomevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* kodieren.

30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ganz besonders Nukleinsäuren, die für die Phosphomevalonat Kinase aus *Arabidopsis thaliana* kodieren und unter

SEQ ID NO:1 beschrieben sind und/oder für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 oder aktive Fragmente davon kodieren.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um 5 einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomicscher DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um DNA-  
10 Fragmente, die der cDNA von Arabidopsispflanzen entsprechen.

Besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

- 15            a)     der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- b)     Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,
- 20            c)     zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,
- d)     Sequenzen, welche an die unter a) oder b) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 35-52°C hybridisieren,
- 25            e)     Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige, bevorzugt eine 85 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt eine 95 %ige Identität mit den unter a) definierten Sequenzen aufweisen,

30

f) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt eine 95 %ige Identität mit den unter b) definierten Sequenzen aufweisen,

5

g) Sequenzen, welche zu den unter a) oder b) definierten Sequenzen komplementär sind, und

10

h) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz codieren wie die unter a) bis f) definierten Sequenzen.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar.

15

Der Ausdruck "vollständige" Phosphomevalonat Kinase wie er hierin verwendet wird, beschreibt die Phosphomevalonat-Kinase, die kodiert wird von einer vollständigen kodierenden Region einer Transkriptionseinheit beginnend mit dem ATG-Startcodon und umfassend alle informationstragenden Exonbereiche des im Herkunftsorganismus vorliegenden, für die Phosphomevalonat-Kinase kodierenden Gens, sowie die für eine korrekte Termination der Transkription nötigen Signale.

20

Der Ausdruck "Gen", wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für einen Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, die für die Synthese einer Polypeptid-Kette verantwortlich ist.

25

Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Pflanzen als *Arabidopsis* isoliert werden, welche für Phosphomevalonat Kinasen

30

kodieren, welche dieselben oder ähnliche Eigenschaften wie die Kinase mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen.

Der Ausdruck "cDNA" wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige Kopie eines RNA-Moleküls und ist deshalb als Kopie biologisch aktiver mRNA intronfrei, d.h. alle kodierenden Regionen eines Gens sind in zusammenhängender Form enthalten.

Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

Die Schmelztemperatur  $T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \log \{c(\text{Na}^+)\] + 0.41(\%G + C)\} - 500/n$  (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Dabei ist c die Konzentration und n die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz >100 bp entfällt der Ausdruck 500/n. Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur 5-15°C unterhalb Tm und einer Ionenstärke von 15 mM Na<sup>+</sup> (entspricht 0.1 x SSC) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um 10-15 °C höher.

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: DIG Easy Hyb (Fa.: Roche)

Hybridisierungstemperatur: 35-52°C, bevorzugt 42°C (DNA-DNA) bzw. 50°C (DNA-RNA).

1. Waschschritt: 2X SSC, 2 mal 5 min bei Raumtemperatur;
2. Waschschritt: 2 mal 15min in 1X SSC, bei 50°C; bevorzugt 0,5X SSC, bei 65°C; besonders bevorzugt 0,2X SSC, bei 65°C.

Der Grad der Identität der Nukleinsäuren wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms NCBI BLASTN Version 2.0.4. (Altschul et al., 1997).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen homologen oder heterologen Promotor umfassen.

5

Der Ausdruck "homologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

10

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

15

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-, T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine erfindungsgemäße regulatorische Region oder ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

25

Bevorzugte Vektoren sind pBIN (Bevan, 1984) und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 (Minet et al., 1992) oder z.B. die p4XXprom. Vektorserie (Mumberg et al.) für Hefezellen, pSPORT-Vektoren (Fa. Life Technologies) für bakterielle Zellen, lambdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen oder den Gateway Vektoren (Fa. Life

Technologies) für verschiedene Expressionssysteme in bakteriellen Zellen oder Baculovirus.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

10 Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, Pflanzen, Froschoozyten und Zelllinien von Säugern.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codiert werden.

20 Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranskriptionale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie 25 beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildung, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoy-

30

lierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als  
5 Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

- 10 Die erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere das Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 müssen nicht vollständige pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen pflanzlichen Phosphomevalonat Kinase aufweisen. Polypeptide, die eine gleichartige biologische Aktivität wie eine Phosphomevalonat Kinase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 ausüben, werden noch als erfindungsgemäß betrachtet. Dabei müssen die erfindungsgemäßen Polypeptide nicht von Phosphomevalonat Kinasen aus Arabidopsis ableitbar sein. Als erfindungsgemäß werden auch Polypeptide betrachtet, die Phosphmevalonat Kinasen beispielsweise der folgenden Pflanzen entsprechen oder Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität dieser ausüben können: Tabak, Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Reis, Roggen, Tomaten, Leguminosen, Kartoffelpflanzen, *Lactuca sativa*, andere Brassicaceen, Holzgewächse, *Physcomitrella patens*.
- 20 25 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region von natürlich vorkommenden Phosphomevalonat Kinasen Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Kinase ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:
- 30

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
- 5 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

<b>Ursprünglicher Rest</b>	<b>Substitution</b>
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Polypeptide, welche zumindest die biochemische Reaktion der Bildung von 5-Pyrophosphomevalonat aus 5-Phosphomevalonat wie die Phosphomevalonat Kinase ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 60 %ige Identität, vorzugsweise 5 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt 97-99 %ige Identität, mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über deren Gesamtlänge aufweist.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit 10 Hilfe des Programms BLASTP + BEAUTY Version 2.0 4. (Altschul et al., 1997).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Phosphomevelonat Kinase (PMVK) mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

15 Die PMVK-Aminosäuresequenz besitzt im Bereich der Aminosäuren 177 bis 186 eine für Kinasen typische potentielle ATP- Bindungsstelle.

Der Ausdruck "biologische Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase", wie er hierin 20 verwendet wird, bedeutet die Fähigkeit zur Umsetzung von 5-Phosphomevalonat zu 5-Pyrophosphomevalonat unter Verbrauch von ATP und der Entstehung von ADP.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch 25 synthetisiert werden. Man kann auch kurze Stücke der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können auch verwendet werden, um ausgehend von Pflanzen-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA-Fragmente ausgewählt. Nach 30

der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren.

5 Die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

10 Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bezeichnet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polypeptide mit Phosphomevalonat Kinase Aktivität, die von einer vorstehend genannten DNA kodiert werden.

15 Dem Fachmann ist bekannt, dass die Polypeptide der vorliegenden Erfindung auf verschiedenem Wege gewonnen werden können, z.B. durch chemische Methoden wie der Festphasenmethode. Zur Gewinnung größerer Proteinmengen empfiehlt sich die Verwendung rekombinanter Methoden. Die Expression eines klonierten Phosphomevalonat Kinase Gens oder Fragmente davon kann in einer Reihe von passenden Wirtszellen erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Zu diesem Zweck wird ein Phosphomevalonat Kinase Gen mit Hilfe bekannter Methoden in eine 20 Wirtszelle eingeführt.

25 Die Integration des klonierten Phosphomevalonat Kinase Gens in das Chromosom der Wirtszelle liegt im Umfang der vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise wird das Gen oder Fragmente davon in ein Plasmid gebracht, und die kodierenden Regionen des Phosphomevalonat Kinase Gens oder Fragmente davon mit einem konstitutiven oder induzierbaren Promotor funktionell verknüpft.

30 Die grundlegenden Schritte zur Herstellung der rekombinanten Phosphomevalonat Kinase sind:

1. Gewinnung einer natürlichen, synthetischen oder semi-synthetischen DNA, die für die Phosphomevalonat Kinase kodiert.
- 5 2. Einbringen dieser DNA in einen Expressionsvektor, der geeignet ist, die Phosphomevalonat Kinase zu exprimieren, entweder alleine oder als Fusionsprotein.
- 10 3. Transformation einer passenden, vorzugsweise prokaryontischen Wirtszelle mit diesem Expressionsvektor.
4. Anzucht dieser transformierten Wirtszelle in einer Weise, die geeignet ist, die Phosphomevalonat Kinase zu exprimieren.
- 15 5. Ernte der Zellen und Aufreinigung Phosphomevalonat Kinase durch geeignete, bekannte Methoden.

Die kodierenden Regionen der Phosphomevalonat Kinase kann dabei mit den üblichen Methoden in *E. coli* exprimiert werden. Geeignete Expressionssysteme für *E. coli* sind kommerziell erhältlich, so die Expressionsvektoren der pET-Serie, z.B. pET3a, pET23a, pET28a mit His-Tag oder pET32a mit His-Tag zur einfachen Aufreinigung und Thioredoxininfusion zur Erhöhung der Löslichkeit des exprimierten Enzyms, sowie pGEX mit Glutathionsynthetase-Fusion, sowie die pSPORT Vektoren mit der Möglichkeit die kodierende Region unterschiedliche Vektoren des Gateway-Systems für verschiedene Expressionssysteme zu transferieren. Die Expressionsvektoren werden in λ DE3-lysogene *E. coli*-Stämme, z.B. BL21(DE3), HMS 174(DE3) oder AD494(DE3) transformiert. Nach dem Anwachsen der Zellen unter dem Fachmann geläufigen Standardbedingungen wird die Expression mit IPTG induziert. Nach Induktion der Zellen wird für 3 bis 24 Stunden bei Temperaturen von 30 18 bis 37°C inkubiert. Die Zellen werden durch Sonifikation in Aufschlusspuffer (10 bis 200 mM Natriumphosphat, 100 bis 500 mM NaCl, pH 5 bis 8 aufgeschlossen.

Das exprimierte Protein kann über chromatographische Methoden gereinigt werden, im Fall von mit His-Tag exprimiertem Protein durch Chromatographie an einer Ni-NTA-Säule.

- 5 Die Expression des Proteins in kommerziell erhältlichen Hefestämmen (z.B. *Pichia pastoris*) oder in Insektenzellkulturen (z.B. Sf9-Zellen) stellt einen anderen günstigen Ansatz dar.

Alternativ können die Proteine auch in Pflanzen exprimiert werden.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden und deren Eigenschaften verändern. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der Terpenoide, die die Bildung ihres Vorläufers Isopentyl-Diphosphat und damit die 15 Funktion der erfindungsgemäßen Phosphomevalonat Kinase notwendig machen, stellen Modulatoren, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen, neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe dar. Modulatoren können Agonisten oder Antagonisten bzw. Aktivatoren oder Inhibitoren sein.

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher insbesondere auch die Verwendung von pflanzlichen Phosphomevalonat Kinasen als Angriffspunkte für Herbizide und ihre Verwendung in Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieses Polypeptids. In solchen Verfahren können die Phosphomevalonat Kinasen direkt, in Extrakten oder aufgereinigt eingesetzt werden, oder mittelbar über die Expression der dafür 25 kodierenden DNA entstehen.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von für pflanzliche PMVK kodierender Nukleinsäuren, diese enthaltende DNA-Konstrukte, diese enthaltende Wirtszellen, oder von an PMVK bindenden Antikörpern zum Auffinden von Modulatoren der PMVK.

Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Phosphomevalonat Kinase beschleunigt oder verstärkt.

5 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der Phosphomevalonat Kinase verlangsamt oder verhindert.

10 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder 15 strukturelle oder funktionelle Mimetika davon. Der Ausdruck "Modulator" umfasst jedoch nicht die natürlichen Substrate sowie ATP.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

20 Die Bindung der Modulatoren an die erfindungsgemäßen Phosphomevalonat Kinasen kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Pflanzen führt.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind damit auch Modulatoren, vorzugsweise Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von pflanzlichen Phosphomevalonat Kinasen, die mit Hilfe eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren des Phosphomevalonat Kinase Proteins oder eines dazu homologen Polypeptids gefunden wurden.

30 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von Modulatoren der Phosphomevalonat Kinase als Herbizide.

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, welche die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide verändern. Auch solche "Expressionsmodulatoren" können neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe darstellen. Expressionsmodulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die regulatorischen Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide codierenden Nukleinsäuren binden. Weiterhin können Expressionsmodulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an regulatorische Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide codierenden Nukleinsäuren bindet, und dadurch deren Expression beeinflusst. Expressionsmodulatoren können auch Antisense-Moleküle sein.

Daher erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide oder von Expressionsmodulatoren als Pflanzenwuchsregulatoren oder Herbizide.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Expressionsmodulatoren von Phosphomevalonat Kinasen, die mit Hilfe eines vorstehend beschriebenen Verfahrens zum Identifizieren von Expressionsmodulatoren des Phosphomevalonat Kinase Proteins oder eines dazu homologen Polypeptids gefunden werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Expressionsmodulatoren als Herbizide.

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening; HTS) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

30

- Um Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro*-Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie ein Zellrohextrakt, oder irgendeine andere Präparation, die das erfindungsgemäße Polypeptid enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder 5 Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des 10 markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, aber nicht die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide auslösen, sind wahrscheinlich gute Antagonisten.
- 15 Die Detektion der biologischen Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide kann durch ein sog. Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind aber nicht beschränkt auf colorimetrisch markierte Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide anspricht oder 20 andere bekannte Bindungstests.
- Modulatoren des erfindungsgemäßen Polypeptids können auch über enzymatische Tests aufgefunden werden. Es kann entweder die Änderung der Enzymaktivität durch entsprechende Modulatoren direkt oder in einem gekoppelten Enzymtest indirekt 25 gemessen werden. Die Messung kann z.B. über Absorptionsänderung durch die Ab- oder Zunahme einer optisch aktiven Verbindung durchgeführt werden.
- Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die 30 erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder

Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfundungsgemäßen Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. radioaktiv oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann.

- 5 Auf diese Weise lässt sich die Effektivität eines Agonisten oder Antagonisten ermessen.

**Beispiel 1**

**Isolierung der für PMVK aus *A. thaliana* kodierenden Nukleinsäure**

5 Mit Hilfe der Methode der „Supression subtractive hybridization“ (Diatchenko et al., 1996) wurde mehrfach ein 370 bp Fragment der PMVK aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* cv. columbia Pflanzen isoliert.

10 Die „Supression subtractive hybridization“ stellt eine Methode zur Isolierung differentiell exprimierter Gene dar. Die zwei zu vergleichenden Proben waren zum einen Arabidopsispflanzen, die 24 Stunden nach Behandlung mit einem Herbizid (Chlorsulfuron, 10g/ha) geerntet wurden, und zum anderen Arabidopsispflanzen, die 24 Stunden nach einer Kontrollbehandlung geerntet wurden. Das 370 bp PMVK-Fragment wurde aus den mit Chlorsulfuron behandelten Pflanzen isoliert, in denen 15 die Transkription der PMVK durch die Behandlung möglicherweise induziert worden war.

20 Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pTAdv (Clontech) kloniert und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Das Fragment der PMVK wurde weiterhin als Sonde für virtual Northern (Clontech) Blots verwendet und zur Isolierung der vollständigen cDNA von PMVK als Sonde eingesetzt.

**Isolierung der vollständigen cDNA Sequenz von PMVK**

25 Es wurde eine Arabidopsis cDNA-Bibliothek der Firma Life Technologies im Plasmid-Vektor pSPORT mit Hilfe des Cloncapture Kits von Clontech nach Angaben des Herstellers gescreent. Im Unterschied zu den Angaben des Herstellers wurde jedoch die Markierung des als Sonde eingesetzten PMVK Fragments mit Biotin nicht mittels PCR sondern mit Hilfe des Biotin High Prime Kit der Firma 30 Boehringer durchgeführt.

Die mit PMVK angereicherte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* Zellen transformiert und über Nacht ausplattiert. Die erhaltenen Kolonien wurden durch Kolonie-PCR mit PMVK-genspezifischen Primern analysiert und positive Kolonien identifiziert.

- 5 Von den positiven Kolonien wurden mit dem Fachmann bekannten Methoden Kulturen angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und die DNA anschließend sequenziert.

**Beispiel 2**

10

Zur Überprüfung einer differentiellen Expression der PMVK in Reaktion auf Chlorsulfuron wurden so genannte virtual Northern Blot Analysen durchgeführt.

15

Bei einem virtual Northern Blot wird mit der SMART Methode der Firma Clontech (siehe Angaben des Herstellers) aus Gesamt-RNA cDNA hergestellt und mit PCR amplifiziert. Es werden nur so wenige PCR Zyklen eingesetzt, dass die Amplifikation sich noch im linearen Bereich der PCR befindet. In vorliegenden Fall zeigte sich ein Optimum zwischen 15 und 18 Zyklen. Die SMART cDNA wird nach dem Fachmann bekannten Methoden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine 20 Nylonmemran übertragen und mit einer mit DIG markierten Sonde hybridisiert. Diese Methode erlaubt die Untersuchung der Expression auch von nur gering exprimierten Genen.

25

Das Ergebniss zeigte eine leichte Induktion der PMVK-Expression durch Chlorsulfuron.

**Beispiel 3**

Ein Testsystem zur Identifizierung von Modulatoren der Phosphomevalonatkina-  
se beruht auf dem ADP-Nachweis des gekoppelten Pyruvatkinase/Lactatdehydro-  
genase-Tests.

Phophoenolpyruvat wird durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt, dieses wird  
dann anschliessend von der Lactatdehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Lactat  
umgesetzt. Der NADH-Verbrauch lässt sich durch die Abnahme der Absorption bei  
340 nm verfolgen.

Bei der Reaktion der PMVK wird ADP gebildet, welches dann über den  
beschriebenen Test nachgewiesen werden kann. Der Einfluss von Modulatoren der  
PMVK auf diese Reaktion kann damit anhand einer Erhöhung odererniedrigung des  
ADP Gehalts bestimmt werden.

**Abbildungen und Sequenzprotokoll**

**Abbildung 1**

Bestimmung der Homologie zwischen der erfindungsgemäßen Phosphomevalonat  
Kinase aus *A. thaliana* gemäß SEQ ID NO:2 und der bekannten Phorphomevalonat  
Kinase aus *S. cerevisiae* (BESTFIT). Die Ähnlichkeit beträgt 44 %, die Indentität  
35 %.

**SEQ ND NO:1**

Nukleinsäuresequenz kodierend für Phosphomevalonat Kinase aus *A. thaliana*.

SEQ ID NO:2

Aminosäuresequenz der Phosphomevalonat Kinase aus *A. thaliana*.

5      SEQ ID NO:3

Nukleinsäurefragment aus *Medicago trunculata* (putative PMVK) der Accession Numbo AA 660847.

10     SEQ ID NO:4

Nukleinsäurefragment aus *Gossypium hirsutum* (putative PMVK) der Accession Number AI 727861.

15     SEQ ID NO:5

Nukleinsäurefragment aus *Pinus radiata* (kodierend für PMVK gemäß WO OO/36081).

Literatur

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.Z.; Miller W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST und PSI-BLAST generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bevan, M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12(22): 8711-8721.
- Croteau, R., 1992. Clomazone Does Not Inhibit the Conversion of Isopentyl Pyrophosphate to Geranyl, Farnesyl, or Geranylgeranyl Pyrophosphate *in Vitro*. *Plant Physiol.* 98, 1515-1517
- Diatchenko, L., Lau, Y. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., Siebert, P. D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030
- Heintze, A., Görlich, J., Schulze-Siebert, D. Schultz, G. 1990. Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. Change from metabolic autonomy to division-of-labor stage. *Plant Physiol.* 93, 1121-1127
- Lottspeich, F., Zorbas H. (Hrsg.). 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Minet, M., Dufour, M.-E. and Lacroute, F. 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2: 417-422.

Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156, 119-122.

5 Norman, M. A., Liebl, R. A., Widholm, J. M., 1990. Site of Clomazone Action in Tolerant-Soybeyn and Susceptible-Cotton Photomixotrophic Cell Suspension Cultures. Plant Physiol. 94, 704-709

10 Weimar, M. R., Balke, N. E., Buhler, D. D., 1992. Herbicide Clomazone Does Not Inhibit *In Vitro* Geranylgeranyl Synthesis from Mevalonate. Plant Physiol. 98, 427-432

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäuren, kodierend für pflanzliche Phosphomevalonat Kinasen, wobei die Nukleinsäurefragmente gemäß SEQ ID NO: 3, 4 und 5 ausgenommen sind.
- 5
2. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie für Phosphomevalonat Kinasen aus *A. thaliana* kodieren.
- 10
3. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.
- 15
4. Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.
- 5
5. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus *A. thaliana* stammen.
- 20
6. Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
  - (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
  - 25
  - (b) Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,
  - (c) zum mindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) oder (b) definierten Sequenzen,
  - 30
  - (d) Sequenzen, welche an die unter (a) oder (b) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 35-52°C hybridisieren,

- (e) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität zu den unter (a) oder (b) definierten Sequenzen aufweisen,
  - 5 (f) Sequenzen, welche zu den unter a) oder b) definierten Sequenzen komplementär sind, und
  - (g) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter a) bis 10 e) definierten Sequenzen.
7. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 und einen heterologen Promotor.
- 15 8. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 7.
9. Vektor gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
- 20 10. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 7 oder einen Vektor gemäß Anspruch 8 oder 9.
- 25 11. Wirtszelle gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle handelt.
12. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine 30 eukaryotische Zelle handelt.

13. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase, welches von einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 codiert wird.
- 5 14. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase, welches eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist.
- 10 15. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 oder 14 bindet.
16. Verfahren zum Herstellen einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend die folgenden Schritte:
  - 15 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder
  - (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer genomischen oder cDNA-Bank, die ausgehend von genomischer DNA bzw. mRNA aus Pflanzenzellen hergestellt wurde, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder
  - 20 (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
- 25 17. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 13, umfassend

- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 gewährleisten, oder
- 5 (b) das Exprimieren einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einem *in vitro*-System, und
- (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem *in vitro*-System.
- 10 18. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 oder 14 bindet und/oder die Aktivität dieses Polypeptids moduliert, umfassend die folgenden Schritte:
- 15 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 13 oder 14 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und
- 20 (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.
19. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, welche die Expression von Polypeptiden gemäß Anspruch 13 verändert, umfassend die folgenden Schritte:
- 25 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,
- 30

- (b) Bestimmen der Polypeptidkonzentration, und
- (c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.

5

20. Verwendung von Phosphomoevalonat Kinasen aus Pflanzen, von dafür kodierenden Nukleinsäuren, DNA-Konstrukten oder Wirtszellen enthaltend diese Nukleinsäuren zum Auffinden von neuen herbiziden Wirkstoffen.

10

21. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Phosphomevalonat Kinase als Pflanzenwuchsregulator oder Herbizid.

15

22. Modulatoren, welche durch ein Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 19 identifiziert werden.

23. Herbizid wirksame Substanzen, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 18 oder 19 gefunden werden.

**Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Phosphomevalonat Kinasen kodieren, die davon die kodierten Polypeptide sowie deren Verwendung als Targets für Herbizide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

- 1 -

### **Abbildung 1**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer AG

<120> Phosphomevalonat Kinasen aus Pflanzen

<130> Le A 35 018

<140>  
<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 2396  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

<220>  
<221> CDS  
<222> (685) .. (2199)

<400> 1  
gtcgacccac gcgtccgggc cgaccttctt ctttttcctt aagacaacac ataatgatag 60  
aagcaaactg gggaaatgtg agatggagtg gtgaagaaca aaaccgtata accgttcgg 120  
tcagaggtgc cgaaccgaac cgaccgtaa accgaaatcc tcaaaagaaa ttgccgatcg 180  
gttgctact gttcaaaacc tcggtgccga gaaccgaaac tgtcggtttt ttccgggtcgg 240  
gtttctcggt ttcttccgaa ctcccaggcc tagttggtt ttattttca cgagtttgc 300  
ttctctttc atcggcgacg acgacgtcga gttctgtca aaacgttaac gatccgactc 360  
gagcgtcgac agtaagagaa gaagacagcg attgtgtgta gatcgacggc gaacgtgtgt 420  
cgatccgtct cgatcgacgg agaatacggt tcgatccggg ttcgatccaa atcggagagt 480  
ttgaggatct aaatcgaaaa ttgcattaat actcatctcc aatctcttct gaagagtccg 540  
aatccgatct accaccacta ctcgtaccgc cggtcattta ctgccgccga tttcaaattta 600  
tccgatcatt tccggcgata tccaatcgca gactgaggtg aatctgggtt tttgatcagc 660  
gattatcttt gtcactcttt gaaa atg gct gtt gct tct gct cct ggg 711  
Met Ala Val Val Ala Ser Ala Pro Gly  
1 5

aaa gtt ttg atg act gga ggc tac ctt gta ctc gag aag cca aat gca 759  
Lys Val Leu Met Thr Gly Gly Tyr Leu Val Leu Glu Lys Pro Asn Ala  
10 15 20 25

ggg ctt gtg ttg agt aca aat gca cgg ttt tac gcg att gtg aag cca 807  
Gly Leu Val Leu Ser Thr Asn Ala Arg Phe Tyr Ala Ile Val Lys Pro  
30 35 40

atc aac gaa gaa gtc aag cct gaa agt tgg gca tgg aaa tgg aca gat 855  
Ile Asn Glu Glu Val Lys Pro Glu Ser Trp Ala Trp Lys Trp Thr Asp  
45 50 55

gtc aaa tta aca tca cca cag ctc tcg aga gaa agc atg tat aaa ctg Val Lys Leu Thr Ser Pro Gln Leu Ser Arg Glu Ser Met Tyr Lys Leu	903
60 65 70	
tca ctg aat cat ttg act ctt cag tct gtg tct gca agt gat tca aga Ser Leu Asn His Leu Thr Leu Gln Ser Val Ser Ala Ser Asp Ser Arg	951
75 80 85	
aac ccc ttt gta gag cat gcg ata cag tat gct ata gct gct gct cat Asn Pro Phe Val Glu His Ala Ile Gln Tyr Ala Ile Ala Ala His	999
90 95 100 105	
ttg gca acc gag aag gac aaa gaa tca ttg cac aaa ctc tta ttg caa Leu Ala Thr Glu Lys Asp Lys Glu Ser Leu His Lys Leu Leu Leu Gln	1047
110 115 120	
ggt ctt gat ata aca ata tta ggc tcc aat gac ttt tac tca tat cgg Gly Leu Asp Ile Thr Ile Leu Gly Ser Asn Asp Phe Tyr Ser Tyr Arg	1095
125 130 135	
aac cag ata gaa tcg gct ggg ctt cca ttg aca cca gaa tcg ctg ggt Asn Gln Ile Glu Ser Ala Gly Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Leu Gly	1143
140 145 150	
acc ctt gca ccg ttt gca tca atc aca ttc aat gct gcg gag tca aat Thr Leu Ala Pro Phe Ala Ser Ile Thr Phe Asn Ala Ala Glu Ser Asn	1191
155 160 165	
ggt gct aat tcc aag cct gaa gta gca aaa act ggc tta ggt tct tct Gly Ala Asn Ser Lys Pro Glu Val Ala Lys Thr Gly Leu Gly Ser Ser	1239
170 175 180 185	
gca gca atg aca aca gct gtg gtt gca gct ctg tta cat tat ctt gga Ala Ala Met Thr Thr Ala Val Val Ala Ala Leu Leu His Tyr Leu Gly	1287
190 195 200	
gtg gtt gac cta tct gat cca tgt aaa gaa gga aag ttt ggc tgt tct Val Val Asp Leu Ser Asp Pro Cys Lys Glu Gly Lys Phe Gly Cys Ser	1335
205 210 215	
gat cta gat gtt atc cat atg ata gca caa acg tct cat tgt ctt gca Asp Leu Asp Val Ile His Met Ile Ala Gln Thr Ser His Cys Leu Ala	1383
220 225 230	
caa ggg aag gtc gga agt ggg ttt gat gtc agc tgt gct gtc tat gga Gln Gly Lys Val Gly Ser Gly Phe Asp Val Ser Cys Ala Val Tyr Gly	1431
235 240 245	
agt cag cgt tat gtt cgc ttc tct cca gaa gtc ttg tca ttt gct cag Ser Gln Arg Tyr Val Arg Phe Ser Pro Glu Val Leu Ser Phe Ala Gln	1479
250 255 260 265	
gtt gca gta aca ggt ctg cca tta aat gaa gtt att ggt aca att ttg Val Ala Val Thr Gly Leu Pro Leu Asn Glu Val Ile Gly Thr Ile Leu	1527
270 275 280	
aag gga aaa tgg gac aat aag aga act gag ttc tct tta cca cca ctg Lys Gly Lys Trp Asp Asn Lys Arg Thr Glu Phe Ser Leu Pro Pro Leu	1575
285 290 295	
atg aat ctt ttc ctt gga gaa cct gga agt ggt gga tcc tcc aca cca Met Asn Leu Phe Leu Gly Glu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Pro	1623
300 305 310	

tca atg gta ggt gca gta aag aag tgg caa atg tct gat cca gag aag	1671
Ser Met Val Gly Ala Val Lys Lys Trp Gln Met Ser Asp Pro Glu Lys	
315 320 325	
gca cga gaa aac tgg cag aat ttg tca gat gca aat tta gaa ctg gaa	1719
Ala Arg Glu Asn Trp Gln Asn Leu Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Glu	
330 335 340 345	
act aag cta aac gat ctg agc aaa tta gct aaa gac cac tgg gat gtt	1767
Thr Lys Leu Asn Asp Leu Ser Lys Leu Ala Lys Asp His Trp Asp Val	
350 355 360	
tat cta cga gtc att aag tct tgt agt gtg ctt act tct gaa aag tgg	1815
Tyr Leu Arg Val Ile Lys Ser Cys Ser Val Leu Thr Ser Glu Lys Trp	
365 370 375	
gtg tta cat gct act gaa cca atc aac gaa gcc att att aaa gaa ctc	1863
Val Leu His Ala Thr Glu Pro Ile Asn Glu Ala Ile Ile Lys Glu Leu	
380 385 390	
tta gag gca aga gaa gct atg ttg agg atc aga att ctt atg cgt cag	1911
Leu Glu Ala Arg Glu Ala Met Leu Arg Ile Arg Ile Leu Met Arg Gln	
395 400 405	
atg ggt gag gcg gct agc gtt ccg ata gag cct gaa tct caa act caa	1959
Met Gly Glu Ala Ala Ser Val Pro Ile Glu Pro Glu Ser Gln Thr Gln	
410 415 420 425	
ctt ttg gat tct aca atg agt gct gaa gga gtt cta ctt gct ggt gtt	2007
Leu Leu Asp Ser Thr Met Ser Ala Glu Gly Val Leu Leu Ala Gly Val	
430 435 440	
cct gga gct ggt gga ttt gat gcc ata ttt gca atc act tta ggg gat	2055
Pro Gly Ala Gly Phe Asp Ala Ile Phe Ala Ile Thr Leu Gly Asp	
445 450 455	
tcc ggc acc aaa ctg acc cag gca tgg agt tcg cac aat gtt ttg gcc	2103
Ser Gly Thr Lys Leu Thr Gln Ala Trp Ser Ser His Asn Val Leu Ala	
460 465 470	
ttg ttg gtg aga gaa gat cca cat ggc gtt tgc cta gaa agt ggt gat	2151
Leu Leu Val Arg Glu Asp Pro His Gly Val Cys Leu Glu Ser Gly Asp	
475 480 485	
cca cga acc aca tgt att act tca ggc gtt tca tca att cac ctt gag	2199
Pro Arg Thr Thr Cys Ile Thr Ser Gly Val Ser Ser Ile His Leu Glu	
490 495 500 505	
taaacaacat tgtttcagtg tccatttatt aggtgcgtca ccaagttcgg ttgagttatac	2259
tgttttgcat atagacttgg gtgctaaatt tcttggtgta agcattttta tacccattgt	2319
aaggctttta actcttggaa aacttgccgg aaaataaaaat aaagttgatt tcaaatcttc	2379
tcaaaaaaaaaaaaaaa	2396

<210> 2  
<211> 505  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Val Val Ala Ser Ala Pro Gly Lys Val Leu Met Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Tyr Leu Val Leu Glu Lys Pro Asn Ala Gly Leu Val Leu Ser Thr Asn  
20 25 30

Ala Arg Phe Tyr Ala Ile Val Lys Pro Ile Asn Glu Glu Val Lys Pro  
35 40 45

Glu Ser Trp Ala Trp Lys Trp Thr Asp Val Lys Leu Thr Ser Pro Gln  
50 55 60

Leu Ser Arg Glu Ser Met Tyr Lys Leu Ser Leu Asn His Leu Thr Leu  
65 70 75 80

Gln Ser Val Ser Ala Ser Asp Ser Arg Asn Pro Phe Val Glu His Ala  
85 90 95

Ile Gln Tyr Ala Ile Ala Ala His Leu Ala Thr Glu Lys Asp Lys  
100 105 110

Glu Ser Leu His Lys Leu Leu Gln Gly Leu Asp Ile Thr Ile Leu  
115 120 125

Gly Ser Asn Asp Phe Tyr Ser Tyr Arg Asn Gln Ile Glu Ser Ala Gly  
130 135 140

Leu Pro Leu Thr Pro Glu Ser Leu Gly Thr Leu Ala Pro Phe Ala Ser  
145 150 155 160

Ile Thr Phe Asn Ala Ala Glu Ser Asn Gly Ala Asn Ser Lys Pro Glu  
165 170 175

Val Ala Lys Thr Gly Leu Gly Ser Ser Ala Ala Met Thr Thr Ala Val  
180 185 190

Val Ala Ala Leu Leu His Tyr Leu Gly Val Val Asp Leu Ser Asp Pro  
195 200 205

Cys Lys Glu Gly Lys Phe Gly Cys Ser Asp Leu Asp Val Ile His Met  
210 215 220

Ile Ala Gln Thr Ser His Cys Leu Ala Gln Gly Lys Val Gly Ser Gly  
225 230 235 240

Phe Asp Val Ser Cys Ala Val Tyr Gly Ser Gln Arg Tyr Val Arg Phe  
245 250 255

Ser Pro Glu Val Leu Ser Phe Ala Gln Val Ala Val Thr Gly Leu Pro  
260 265 270

Leu Asn Glu Val Ile Gly Thr Ile Leu Lys Gly Lys Trp Asp Asn Lys  
275 280 285

Arg Thr Glu Phe Ser Leu Pro Pro Leu Met Asn Leu Phe Leu Gly Glu  
290 295 300

Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ser Thr Pro Ser Met Val Gly Ala Val Lys  
305 310 315 320

Lys Trp Gln Met Ser Asp Pro Glu Lys Ala Arg Glu Asn Trp Gln Asn  
325 330 335

Leu Ser Asp Ala Asn Leu Glu Leu Glu Thr Lys Leu Asn Asp Leu Ser  
340 345 350

Lys Leu Ala Lys Asp His Trp Asp Val Tyr Leu Arg Val Ile Lys Ser  
355 360 365

Cys Ser Val Leu Thr Ser Glu Lys Trp Val Leu His Ala Thr Glu Pro  
370 375 380

Ile Asn Glu Ala Ile Ile Lys Glu Leu Leu Glu Ala Arg Glu Ala Met  
385 390 395 400

Leu Arg Ile Arg Ile Leu Met Arg Gln Met Gly Glu Ala Ala Ser Val  
405 410 415

Pro Ile Glu Pro Glu Ser Gln Thr Gln Leu Leu Asp Ser Thr Met Ser  
420 425 430

Ala Glu Gly Val Leu Leu Ala Gly Val Pro Gly Ala Gly Gly Phe Asp  
435 440 445

Ala Ile Phe Ala Ile Thr Leu Gly Asp Ser Gly Thr Lys Leu Thr Gln  
450 455 460

Ala Trp Ser Ser His Asn Val Leu Ala Leu Leu Val Arg Glu Asp Pro  
465 470 475 480

His Gly Val Cys Leu Glu Ser Gly Asp Pro Arg Thr Thr Cys Ile Thr  
485 490 495

Ser Gly Val Ser Ser Ile His Leu Glu  
500 505

<210> 3  
<211> 611  
<212> DNA  
<213> *Medicago truncatula*

<400> 3  
ctgttatctg agttgaagaa atatcacaat atcaatggcc gtggtggttg cttctgctcc 60  
tgggaagggtg ttaatgaccg gtggctacct agtttagag agacctaattt ctggacttgt 120  
tcttagtact aatgctcggtt ttatgcataat tgcataaccat atctatcgttc aaactaaacc 180  
tgattcttgg gcttgggctt ggtcagatgt cagattaaca tctccctcaac tctccagaga 240  
agccttctat aaatttagcac tcaaaaatct taccatccaa actgtttctt caagtgaaac 300  
aaggaaccct tttgtggaat atgctgtca atactccgtg gctgccgcct atgcaacagc 360  
tgaccagaat aaaaaggact tggtgcacaa actacttttgc caaggcttttgc acattacaat 420  
tttgggttcc aatgatttt attctttagt gaatgagatt gagagacacg gactcccttt 480  
gacatcgaaa tcattggcca ccctccgcct tttgcctcc atttcttca atactgatga 540  
tgctaatttggaa aggaatttgc agcctgaaat tgccaaaact gggttggct catctgcagc 600  
aatgacaacc g 611

<210> 4  
<211> 728  
<212> DNA  
<213> *Gossypium hirsutum*

<400> 4  
cgtttttacg ctattgttaa gccaatttcat gaagcttatca agcctgaaag ctgggcattgg 60  
tcttggaccg atgtcaagct aacatctcct cagctttcca gagaaagcat gtataaattt 120

tctcgaaac attaaacact tcagtgtta tcttcaagtg aatcaaggaa ccctttgt 180  
gaaaatgcta ttcaatac tatagcagct gcacatgcaa cattgacaa gaataagaaa 240  
gaggcattag ataaactact cttacaaggc cttgatatta cgatcttagg ttgcaatgac 300  
tttactcat acagaatca gatagaagca cttggcttc cggtgacacc tgaagcattg 360  
gctactctac caccgttac atcaattaca ttcaattctg aggaatcaaa tggagcaa 420  
tgcaaaccctg aagttgcaaa aactggattt ggttcatctg cagcaatgac aactgctgt 480  
gttgctgctt tacttcatta tcttgggtt gttaaccttt ccaccccttc tgcagatcaa 540  
caccaagaaa ataagaattc cacagatctc gatattgtgc atatgatagc tcaaagtgcc 600  
cactgtattt cccaaaggtaa agttggcagt ggcttgcatt tcagttctgc tgtctatggg 660  
agtcaagcgtt atgttcgtt ttccacaaaa gtgtttctg ctgctcaggc tgcantgaaa 720  
gggatgcc 728

<210> 5  
<211> 571  
<212> DNA  
<213> Pinus radiata

<400> 5  
cacaggcgaa accctctcct gctgctcacg gttgataaac cctcaatatt tgccgttaggg 60  
ctccagatt actgaatct gccagtaaga gtccgttgtg gcggaaagaga gctgccgaga 120  
gctgccgagc tggagagcac cattcgacc atatagagaa ggggggttat agattcctgg 180  
tcaaggaaaa ctgacaataa ggtgaaaaaa acaataatta cttcagatt atctgatcat 240  
cacatggctg tagttgtgtc agtccttgtt aaggtttaa taacaggagc ttatctaatt 300  
cttgagaagc caaatccagg acttgtgtt accaccacag ctcgcttcta cgccatttgt 360  
aagccactgc ggactagcac agattccagt agttggcat ggctatggac agatgtgaaa 420  
ttaacatcgc ctcagcttgc aaaggagggcc atctacaagc tatctctgaa gactcttagc 480  
ctgcaaaatg ttgcttcttc aagtagcaat ggttaatcctt ttgtggaaca agcagtgcaa 540  
tttgctgttg cagctgcaaa agaaggcctt g 571